

学位論文

「安定同位体標識ペプチドを用いた血清蛋白メチオニン残基の  
酸化定量法の確立」

DM16030 桃園 明

北里大学大学院医療系研究科博士課程  
臨床医科学群 内分泌代謝内科学  
指導教授 七里 眞義

## 著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

【背景】酸化ストレスとは“生体内における活性酸素種と抗酸化システムとのバランス”と定義され、酸化ストレスの上昇は DNA や RNA、たんぱく質や脂質など分子レベルで酸化損傷を増加させ、様々な疾病の発症や老化に関わっていると考えられている。その一方で酸化ストレスマーカーの定量は活性酸素種が非常に不安定であるために困難なことが多く、現在、主流となっている酸化ストレスマーカーは活性酸素によって酸化された代謝産物を測定しているものがほとんどである。著者らは以前、酸化状態を鋭敏に反映する指標としてタンパク質のメチオニン残基の酸化に着目した。そして新たな酸化ストレスマーカーとして、質量分析計を用いて血清中蛋白のメチオニン残基の酸化定量法を確立した。このメチオニン酸化定量法は 2 型糖尿病患者では健常者に比べて有意に高値を示すことも確認している。

【目的】本研究ではメチオニン酸化定量法をさらに安定的で再現性のある測定法にするために、安定同位体標識ペプチドを用いて血清アルブミンの 147 番メチオニン残基の酸化定量法を確立し、以前の方法と比較した。

【方法】北里大学病院内分泌代謝内科に通院中の患者および健常者より血液を採取し、室温で 1 時間静置後、1000g で 20 分間遠心分離した。分離した血清は -80℃ に保存し、測定時に溶解して使用した。血清 5μL を界面活性剤の入った溶液で 40 倍に希釈し、血清アルブミンの 147 番メチオニン残基を含む安定同位体標識ペプチドを添加した。還元・アルキル化処理を行い、L-システインを添加した。トリプシン・リシルエンドペプチダーゼを添加し 37℃ で 24 時間酵素消化した。界面活性剤を除くために 10% アセトニトリルと 5% トリフルオロ酢酸を加えて、酸性沈殿を行い、上澄みに L-メチオニンを添加した。血清 0.1μL 相当を質量分析計で測定した。血清アルブミンの 147 番メチオニン残基を含むペプチドの濃度を安定同位体標識ペプチドの添加量から計算し、酸化型と非酸化型ペプチドの濃度比をメチオニン酸化レベルとして解析した。また酸化ストレスマーカーとして有用であるか確認するために健常者と 2 型糖尿病患者でメチオニン酸化レベルを比較した。

【結果】メチオニン酸化定量法をより正確で安定的な測定法にするために 5 つの項目に関して検討を行った。

#### ① L-メチオニンによるメチオニン自然酸化の抑制効果

健常者 9 名の血清を用いて血清試料のトリプシン消化後に L-メチオニンを添加した場合と添加しなかった場合のメチオニン酸化レベルを試料調製直後、1 週間後、1 か月後に比較した。L-メチオニンを添加しなかった試料は 1 週間後の時点ですでにメチオニン酸化レベルが亢進し ( $2.216 \times 10^{-3} \pm 0.696 \times 10^{-3}$  vs  $3.597 \times 10^{-3} \pm 1.634 \times 10^{-3}$   $P < 0.005$ )、1 か月後ではさらに酸化が進んでいた ( $3.609 \times 10^{-3} \pm 0.970 \times 10^{-3}$  vs  $10.48 \times 10^{-3} \pm 4.966 \times 10^{-3}$   $P < 0.005$ )。

#### ② L-システインによる N 端カルバミドメチル化の抑制効果

健常者 9 名の血清を用いて、血清試料のトリプシン消化前に L-システインを添加した場合と添加しなかった場合で非酸化型 N 端カルバミドメチル化ペプチドの extracted ion chromatogram (XIC) 強度を比較した。血清由来ペプチド、安定同位体標識ペプチドのい

いずれも L-システインを添加した試料は有意に N 端のカルバミドメチル化が抑制されていた。  
( $0.137 \times 10^9 \pm 0.052 \times 10^9$  vs  $9.641 \times 10^9 \pm 0.571 \times 10^9$   $p < 0.005$ ,  $1.017 \times 10^9 \pm 0.191 \times 10^9$  vs  $57.72 \times 10^9 \pm 2.932 \times 10^9$   $p < 0.005$ )

### ③長期間保存した血清のメチオニン酸化レベル

健常者 6 名の血清を用いて血液採取直後にトリプシン消化して得られたメチオニン酸化レベルと -80°C に 2 年間保存した後にトリプシン消化して得られたメチオニン酸化レベルを比較したところ、有意な差は認めなかった。

### ④血液採取から遠心分離までの時間とメチオニン酸化レベル

健常者 6 名から血液を採取し、遠心分離まで 10 分、30 分、1 時間、2 時間、3 時間、6 時間、室温に静置した後に遠心分離・酵素消化を行い、メチオニン酸化レベルを比較した。血液採取から遠心分離までの時間はメチオニン酸化レベルに影響を与えなかった。

### ⑤安定同位体標識ペプチドを用いた測定法と用いない測定法の比較

同じ血清試料で安定同位体標識ペプチドを用いた測定法と安定同位体標識ペプチドを用いていない以前の測定法でメチオニン酸化レベルを繰り返し測定し、測定間誤差を比較した。いずれも L-システインや L-メチオニンを添加して測定した。15 回の測定の測定間誤差は安定同位体標識ペプチドを用いていない以前の測定法の変動係数が 20.9%、安定同位体標識ペプチドを用いた今回の測定法の変動係数が 10.7%であり、安定同位体標識ペプチドを用いた今回の測定法が非常に再現性のある測定法であることを確認した。

### ⑥健常者と 2 型糖尿病患者におけるメチオニン酸化レベルの比較

酸化ストレスマーカーとして有用であるかどうかを確認するために健常者 34 名(男性 11 名、平均年齢  $55.0 \pm 16.8$  歳、平均 HbA1c  $5.5 \pm 0.4\%$ )と 2 型糖尿病患者 40 名(男性 26 名、平均年齢  $55.3 \pm 13.1$  歳、平均 HbA1c  $8.9 \pm 2.2\%$ )でメチオニン酸化レベルを比較した。糖尿病患者では健常者に比し、メチオニン酸化レベルが有意に高値を示した( $15.02 \times 10^{-4} \pm 2.622 \times 10^{-4}$  vs  $17.30 \times 10^{-4} \pm 4.590 \times 10^{-4}$ ,  $P < 0.05$ )。

【考察】質量分析計によるメチオニン酸化定量法を改良した。安定同位体標識ペプチドを試料に加えて同時に酵素消化を行い、質量分析計で解析することによりメチオニン残基を含むペプチド濃度の定量を可能にし、より安定的で再現性のあるメチオニン酸化定量法を確立した。また L-システインや L-メチオニンを加えることでアルキル化に伴う副反応やメチオニン残基の自然酸化を抑制し、正確にペプチドを定量することができた。この測定法は血液採取から遠心分離までの時間によらず、保存血清は最長 2 年間、安定的に測定可能である。この測定法によるメチオニン酸化レベルは糖尿病患者群で有意に高値であり、新たな酸化ストレスマーカーとなりうる可能性が示唆された。今後は糖尿病を含めた様々な病態との関連を調べていくことで病態生理を解明していければと考えている。



## 目次

	頁
1. 序論 .....	1
2. 方法	
2-1. 研究対象者 .....	1
2-2. 血液サンプルの収集 .....	1
2-3. 安定同位体標識ペプチドの合成 .....	2
2-2. 血清の試料調製 .....	2
2-4. 液体クロマトグラフィー-質量分析法(LC-MS) .....	2
2-5. 評価方法 .....	3
2-6. 統計解析方法 .....	3
2-7. 倫理 .....	3
3. 結果	
3-1. メチオニン酸化レベルの基礎的検討	
3-1-1. L-メチオニン添加によるメチオニン自然酸化の抑制効果に関する検討----	3
3-1-2. L-システイン添加による N 端カルバミドメチル化の抑制効果に関する 検討-----	3
3-1-3. 長期保存によるメチオニン酸化への影響の検討-----	4
3-1-4. 血液採取～遠心分離までの時間とメチオニン酸化への影響-----	4
3-1-5. 安定同位体標識ペプチドを用いた測定法と用いない測定法の測定間誤差	4
3-2. 糖尿病患者におけるメチオニン酸化状態	4
3-2-1. 患者背景 .....	4
3-2-2. 健常者と糖尿病患者のメチオニン酸化レベル-----	4
4. 考察	5
4-1. 今回のメチオニン酸化定量法の安定性について-----	5
4-2. 酸化ストレスマーカーとしての有用性に関して-----	6
5. 総括 .....	6
6. 今後の課題 .....	6

7. 謝辞	6
8. 引用文献	6
9. 業績目録	9
10. 図表	10

## 1. 序論

酸化ストレスとは生体内の酸化物質と抗酸化物質の作用バランスが崩れ、細胞や組織が酸素による障害を受けてダメージが蓄積することである。生体内分子の酸化修飾は細胞の機能障害を起こし、病気の発症に寄与する。酸化ストレスは糖尿病<sup>1)-3)</sup> や心血管疾患<sup>4), 5)</sup>、慢性腎不全<sup>6)-8)</sup>、神経変性疾患<sup>9), 10)</sup>、悪性腫瘍<sup>11), 12)</sup>など様々な疾患の発症・進展に寄与している。特に糖尿病では酸化ストレスの上昇が細小血管障害や大血管障害などの合併症に関与していることが示唆されている<sup>1)-2)</sup>

一方で酸化ストレスマーカーの定量は活性酸素種が非常に不安定であるために困難なことが多く、現在、主流となっている酸化ストレスマーカーは活性酸素によって酸化された代謝産物を測定しているものがほとんどである。そこで新たな酸化ストレスマーカー開発のために酸化状態を鋭敏に反映する指標としてタンパク質のメチオニン残基の酸化に着目した<sup>13)</sup>。生体内でメチオニン残基は非常に酸化されやすいアミノ酸の一つであり、体内の抗酸化物質としても広く知られている<sup>14)</sup>。メチオニン残基は酸化されるとメチオニンスルホキシドに変換されるが、メチオニンスルホキシドレダクターゼの作用により元の状態に戻る<sup>15)-18)</sup>。生体内ではこの酵素活性があるために酸化されても還元されやすいとされている。このためメチオニン残基の酸化を用いた酸化ストレスの定量法の開発はあまり行われてこなかった。しかし、過去にヒト血中蛋白にはメチオニンスルホキシドレダクターゼの阻害作用を有する物質が存在するとの報告もあり<sup>10), 19)</sup>、実際に著者らは質量分析計を用いてヒト血清蛋白のメチオニン残基の酸化レベルが容易に変化せず、きわめて安定的に定量できることを確認した<sup>13)</sup>。さらにメチオニン酸化定量法を用いて一部の血清蛋白のメチオニン残基の酸化が2型糖尿病患者では健常者に比べて有意に亢進していることを確認している。メチオニン残基の酸化が糖尿病患者のどのような病態と関係しているのか解明していくことは糖尿病の病態や合併症の発症・進展阻止の解明のために重要なことである。

本研究ではメチオニン酸化定量法をより安定的で再現性のある測定法に改良するための検討を行い、以前の測定法との比較を行った。また改善された測定法が酸化ストレスマーカーとして有用かどうかを確認するために健常者と2型糖尿病患者の血清を用いてメチオニン酸化レベルを比較した。

## 2. 方法

### 2-1. 研究対象者

2016年5月から2019年6月までの間に北里大学病院内分泌代謝内科で加療を行った40名の2型糖尿病患者および健常ボランティア34名を対象とした。2型糖尿病の診断は日本糖尿病学会の診断基準を用いて診断した<sup>20)</sup>。全ての患者の診療記録を確認し、急性炎症性疾患や悪性腫瘍、直近での脳血管疾患や心血管疾患のある患者は除外した。

### 2-2. 血液サンプルの収集

全ての研究対象者より静脈血採血を行った。静脈血は凝固促進剤入り採血管に吸引し、室温に1時間静置後、1000gで20分間、遠心分離した。得られた血清は-80℃に保存し、測定時に溶解して使用した。

### 2-3. 安定同位体標識ペプチドの合成

安定同位体標識ペプチドは質量分析計での測定時に内部標準として加えることで目的試料の定量を可能にする<sup>21)22)</sup>。以前のメチオニン酸化定量法で糖尿病患者において酸化が亢進していたアルブミンの147番メチオニン残基を含むトリプシン消化ペプチドを安定同位体標識し、血清蛋白のトリプシン消化前に内部標準として加えた。安定同位体標識ペプチドは株式会社スクラムにより、N-9-フルオレニルメトキシカルボニル-L-フェニルアラニンを用いて合成された。

メチオニン非酸化型安定同位体標識ペプチド：

LVRPEVDVMC(Carbamidomethyl)TAFHDNEET**FLK**

メチオニン酸化型安定同位体標識ペプチド：

LVRPEVDVM(Oxidation)C(Carbamidomethyl)TA**F**HDNEET**FLK**

赤色は安定同位体標識されたアミノ酸。

### 2-4. 血清の試料調製

血清5 µLに20 mM 重炭酸トリエチルアンモニウム(TEAB)/12 mM デオキシコール酸ナトリウム/12 mM ラウリル硫酸ナトリウム混合溶液195 µLを添加して40倍希釈した。希釈血清20 µL(血清0.5 µL相当)に安定同位体標識ペプチド10 µLを添加した。500 mM トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン0.8 µLと200 mM TEAB 1.2 µLを添加し、50℃で30分間反応させた。377 mM ヨードアセトアミド2 µLを添加したのち、遮光して室温で30分間反応させた。400 mM L-システイン2 µLを添加し、遮光して室温で10分間反応させた。100 ng/µL リシルエンドペプチダーゼ2 µL, 100 ng/µL トリプシン2 µLを添加し、37℃で24時間反応させた。反応後、半量の18 µLに10% アセトニトリル50 µLと5% トリフルオロ酢酸50 µLを添加し、19,000gで15分間遠心し、上澄みを回収した。100 mM L-メチオニン2 µLを添加し、血清0.1 µL相当を質量分析計で解析した。

### 2-5. 液体クロマトグラフィー質量分析法(LC-MS)

血清蛋白トリプシン消化ペプチドの解析はLC-MSで行った。メチオニン酸化レベルの定量解析は溶媒流速200 µL/minの汎用液体クロマトグラフィー(LC)(資生堂)と質量分析計であるLTQ-Orbitrap Discoverer(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)/Q-Exactive(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)を組み合わせたLC-MSで解析した。得られたデータから定量解析用ソフトSkyline3.7.0.11317<sup>23)</sup>を用いて、酸化型メチオニンを含むペプチドと非酸化型メチオニンを含むペプチドの質量電荷比(m/z)における相対



強度をプロットしたイオンクロマトグラム(extracted ion chromatogram:XIC)強度を求めた。

## 2-6. 評価方法

内部標準として加えた安定同位体標識ペプチドの添加量と XIC 強度から血清中のアルブミン 147 番メチオニン残基を含むトリプシン消化ペプチドの濃度を求め、酸化型ペプチドの濃度を非酸化型ペプチドの濃度で除した値をメチオニン酸化レベルとした。

## 2-7. 統計解析方法

統計解析は GraphPad Prism 5.02 software および JMP ver. 5.0.1a を用いた。データはその他の表示がない限り、平均±標準偏差で記載した。

血液採取後～遠心分離までの時間とメチオニン酸化レベルの検討では one-way ANOVA を用いた。糖尿病患者と健常者のメチオニン酸化レベルの比較には Mann-Whitney U 検定を用いた。その他の 2 群間の比較は Wilcoxon signed-rank test を用いた。P 値は 0.05 未満を有意とした。

## 2-8. 倫理

本研究は、北里大学医学部・病院倫理委員会の承認を得て行った(B15-181, B17-040)。

# 3. 結果

## 3-1. メチオニン酸化定量法の基礎的検討

### 3-1-1. L-メチオニンによるメチオニン自然酸化の抑制効果に関する検討

健常者 9 名の血清を用いて血清試料に L-メチオニンを添加することでメチオニン残基の自然酸化を抑制することができるかに関して検討を行った。血清試料のトリプシン消化後に 100mM L-メチオニン 2 $\mu$ L を添加した場合と添加しなかった場合でメチオニン酸化レベルを試料調製直後、1 週間後、1 か月後に比較した。L-メチオニンを添加しなかった試料は、1 週間後の時点ですでにメチオニン酸化レベルが亢進し( $2.216 \times 10^{-3} \pm 0.696 \times 10^{-3}$  vs  $3.597 \times 10^{-3} \pm 1.634 \times 10^{-3}$   $P < 0.005$ )、1 か月後ではさらに酸化が亢進していることがわかった( $3.609 \times 10^{-3} \pm 0.970 \times 10^{-3}$  vs  $10.48 \times 10^{-3} \pm 4.966 \times 10^{-3}$   $P < 0.005$ ) (表 1)。

### 3-1-2. L-システインによる N 端カルバミドメチル化の抑制効果に関する検討

健常者 9 名の血清を用いて還元・アルキル化処理後に過剰の L-システインを添加することでアルキル化の副反応としておきる N 末端のカルバミドメチル化を抑制できるかに関して検討を行った。信号強度の強さから非酸化型ペプチドの XIC 強度を評価した。血清試料のトリプシン消化前に 400mM L-システインを 2  $\mu$ L 添加した場合と添加しなかった場合の N 端カルバミドメチル化ペプチドの XIC 強度を比較した。L-システインを添加しなかった血清由来の N 端カルバミドメチル化ペプチドは有意に XIC 強度が亢進していた

( $0.137 \times 10^9 \pm 0.052 \times 10^9$  vs  $9.641 \times 10^9 \pm 0.571 \times 10^9$   $p < 0.005$ )。同様に L-システインを添加しなかった安定同位体標識 N 端カルバミドメチル化ペプチドは有意に N 端がカルバミドメチル化されていた( $1.017 \times 10^9 \pm 0.191 \times 10^9$  vs  $57.72 \times 10^9 \pm 2.932 \times 10^9$   $p < 0.005$ ) (表 2)。

### 3-1-3. 長期保存によるメチオニン酸化レベルへの影響の検討

長期間保存した血清でもメチオニン酸化レベルが変わらないのかどうかを調べるために、健常者 6 名の血清を用いて血液採取直後にトリプシン消化して得られたメチオニン酸化レベルと血清を  $-80^\circ\text{C}$  に 2 年間保存した後にトリプシン消化して得られたメチオニン酸化レベルを比較した。両者に有意な差は認めなかった(図 1)。

### 3-1-4. 血液採取～遠心分離までの時間とメチオニン酸化レベルへの影響

血液採取から遠心分離までの時間がメチオニン酸化レベルに影響するかどうかを調べた。健常者 6 名から血液を採取し、遠心分離まで 10 分、30 分、1 時間、2 時間、3 時間、6 時間置いた場合のメチオニン酸化レベルを比較した。遠心時間による有意な差は認めなかった(図 2)。

### 3-1-5. 安定同位体標識ペプチドを用いた測定法と用いない測定法の測定間誤差

同じ血清試料で安定同位体標識ペプチドを用いた測定法と安定同位体標識ペプチドを用いていない以前の測定法でメチオニン酸化レベルを繰り返し測定し、測定間誤差を比較した。いずれも L-システインや L-メチオニンを添加して測定を行った。15 回の測定の測定間誤差は安定同位体標識ペプチドを用いていない測定法の変動係数が 20.9%、安定同位体標識ペプチドを用いた今回の測定法の変動係数が 10.7%であり、安定同位体ペプチドを用いた今回の測定法は非常に安定的で再現性のある測定法であることを確認した。

## 3-2. 糖尿病患者におけるメチオニン酸化状態

### 3-2-1. 患者背景

研究対象者の背景を表 3 に示す。Body Mass Index、HbA1c、血清クレアチニン、中性脂肪は患者群で有意に高値であった。HDL コレステロールは健常者群で有意に高値であった。年齢、eGFR、LDL コレステロール、総ビリルビン値は 2 群間で有意な差を認めなかった。

### 3-2-2. 健常者と糖尿病患者のメチオニン酸化レベルの比較

酸化ストレスマーカーとして有用であるかどうかを確認するために健常者 34 名と 2 型糖尿病患者 40 名のメチオニン酸化レベルを比較した。糖尿病患者では健常者に比し、メチオニン酸化レベルは有意に高値であった( $15.02 \times 10^{-4} \pm 2.622 \times 10^{-4}$  vs  $17.30 \times 10^{-4} \pm 4.590 \times 10^{-4}$ ,  $P < 0.05$ )。



## 4. 考察

### 4-1. 今回のメチオニン酸化定量法の安定性について

以前に報告したメチオニン酸化定量法をさらに安定的で再現性のある測定法にするために3つの改善点を加えた。

メチオニンはタンパク質の中で最も酸化されやすいアミノ酸のひとつで、酸化されると蛋白の構造変化や機能障害を起こす<sup>24)26)</sup>。そのため酸化ストレス状態や老化を反映する重要な翻訳後修飾として考えられてきた<sup>26)</sup>。その一方で酸化されやすいという特性がメチオニン残基を用いた酸化ストレスの定量法を困難にさせる主要因であるとされてきた。そこで試料をトリプシン消化する際にL-メチオニンをあらかじめ過剰に置いておくことで、L-メチオニンがメチオニン残基の代わりに酸化され、結果としてメチオニン残基の自然酸化を抑制できるのではないかと考えた。L-メチオニンを添加した血清試料は添加しなかった試料に比べて有意にメチオニンの自然酸化を抑制した。またその効果は1か月後まで持続していることが示された。

次にアルキル化処理の副反応として起こるN末端のカルバミドメチル化に注目した。血清蛋白をLC-MSで解析するには、まず蛋白を酵素消化してペプチドにする必要があるが、加熱して蛋白の高次構造を壊したときに、一度外れたS-S結合が再結合しないようにアルキル化という処理を行う。その際、副反応としてN末端のカルバミドメチル化が起きることがある。N端がカルバミドメチル化されたペプチドは本来のペプチドと分子量が変わってしまうため別のペプチドとしてLC-MSでは同定される。そのためN端のカルバミドメチル化を抑制することは目的のペプチドを正確に測定するために重要なことである。そこでN端のカルバミドメチル化を抑制するために過剰のL-システインをトリプシン消化前に添加した。L-システインを過剰に添加した試料は添加しなかった試料に比べてN端カルバミドメチル化ペプチドのXIC強度は低値であり、N端のカルバミドメチル化を抑制できていることが確認された。このことからL-システイン、L-メチオニンを添加した方が試料の正確なメチオニン酸化レベルを定量できることが示された。

また以前のメチオニン酸化定量法はトリプシン消化ペプチドを質量分析計で解析し、メチオニン酸化型ペプチドと非酸化型ペプチドの信号強度比をメチオニン酸化比として報告していた<sup>28)</sup>。以前の方法では質量分析計のカラムなどの状態により信号強度が影響を受けることがあった。そこで今回、あらかじめ濃度のわかっている安定同位体標識ペプチドを血清試料に加え、同時にトリプシン消化・質量分析を行い、メチオニン残基を含むペプチドの濃度を定量した。メチオニン酸化型ペプチドと非酸化型ペプチドの濃度比をメチオニン酸化レベルとすることで正確に絶対量を比較することができた。L-システインやL-メチオニンを添加したうえで、安定同位体標識ペプチドを用いない測定法と安定同位体標識ペプチドを用いた測定法の測定間誤差を比較すると、変動係数は15回の測定で各々20.9%, 10.7%であった。これらの改善により質量分析計の状態によらないより正確な定量法を確

立することができた。

#### 4-2. 酸化ストレスマーカーとしての有用性に関して

改善を加えたメチオニン酸化定量法が酸化ストレスマーカーとして有用であるか確認する必要があると考えた。糖尿病患者では酸化ストレスの上昇が糖尿病合併症の発症・進展に関与することが示唆されている<sup>1)-3),28)</sup>。そこで2型糖尿病患者と健常者の血清を用いてメチオニン酸化比レベルを比較した。2型糖尿病患者では健常者に比べて有意にメチオニン酸化レベルが亢進していた。安定同位体標識ペプチドを用いたメチオニン酸化定量法は新たな酸化ストレスマーカーとなりうる可能性が示唆された。

### 5. 総括

安定同位体標識ペプチドを用いて非常に安定的にかつ再現性よくメチオニン酸化レベルを定量できる方法を報告した。またL-システインやL-メチオニンを加えることでより正確な定量を可能にした。この測定法は2年間凍結保存しておいた血清でも安定的に測定することができる。改良を加えた測定法で解析したメチオニン酸化レベルは2型糖尿病患者で有意に亢進しており、新規酸化ストレスマーカーとして有用である可能性が示された。

### 6. 今後の課題

今回の検討では糖尿病患者でメチオニン酸化が亢進していることは示されたが、サンプルサイズが少なく、糖尿病患者だけでメチオニン酸化が亢進している要因を評価することができなかった。今後はサンプル数を増やして再解析を行いたい。同様に1型糖尿病と2型糖尿病でメチオニン酸化に影響する因子が異なるのか検討していきたい。また他の酸化ストレスマーカーとの比較も必要であると考ええる。

### 7. 謝辞

本研究および学位論文作成に際してご指導を頂きました七里 眞義 教授、小寺 義男教授に深く感謝いたします。また技術員の加藤 利佳さん、加藤 由起子さん、大橋 潤子さん、理学部物性物理学講座の学生方、本学内分泌代謝内科学の諸先生方には多大なるご協力をいただきこの場をお借りして御礼を申し上げます。

### 8. 参考文献

- 1) Giugliano, D., Ceriello, A. & Paolisso, G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes care* 1996;19:257-26.
- 2) Pitocco, D., Tesaro, M., Alessandro, R., Ghirlanda, G. & Cardillo, C. Oxidative stress in



diabetes: implications for vascular and other complications. *Int J Mol Sci* 2013;14:21525-21550 .

- 3) Nishikawa, T. et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000;404:787-790.
- 4) Drummond, G. R., Selemidis, S., Griendling, K. K. & Sobey, C. G. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10:453-471.
- 5) Madamanchi, N. R., Vendrov, A. & Runge, M. S. Oxidative stress and vascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2005;25:29-38.
- 6) Cachofeiro, V. et al. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney Int* 2008; Suppl S4-9.
- 7) Daenen, K. et al. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatric nephrology* 2019;34: 975-991.
- 8) Himmelfarb, J., Stenvinkel, P., Ikizler, T. A. & Hakim, R. M. The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int* 2002;62:1524-1538.
- 9) Schoneich, C. Methionine oxidation by reactive oxygen species: reaction mechanisms and relevance to Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2005;1703: 111-119.
- 10) Glaser, C. B., Yamin, G., Uversky, V. N. & Fink, A. L. Methionine oxidation, alpha-synuclein and Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 2005;1703:157-169.
- 11) Gorrini, C., Harris, I. S. & Mak, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12:931-947.
- 12) Sosa, V. et al. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing research reviews* 2013;12:376-390.
- 13) Suzuki, S. et al. Methionine sulfoxides in serum proteins as potential clinical biomarkers of oxidative stress. *Sci Rep* 2016;6: 38299,doi:10.1038/srep38299,1-10.
- 14) Levine, R. L., Mosoni, L., Berlett, B. S. & Stadtman, E. R. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:15036-15040.
- 15) Ezraty, B., Aussel, L. & Barras, F. Methionine sulfoxide reductases in prokaryotes. *Biochim Biophys Acta* 2005;1703:221-229.
- 16) Kim, G., Weiss, S. J. & Levine, R. L. Methionine oxidation and reduction in proteins. *Biochim Biophys Acta* 2014;1840: 901-905.
- 17) Weissbach, H., Resnick, L. & Brot, N. Methionine sulfoxide reductases: history and cellular role in protecting against oxidative damage. *Biochim Biophys Acta* 2005;1703:203-212.
- 18) Zhang, X. H. & Weissbach, H. Origin and evolution of the protein-repairing enzymes methionine sulphoxide reductases. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2008;83: 249-257.

- 19) Glaser, C. B. et al. Studies on the turnover of methionine oxidized alpha-1-protease inhibitor in rats. *Am Rev Respir Dis* 136, 857-861 (1987).
- 20) 清野 裕, 南條 輝志男, 田嶋 尚子, 門脇 孝, 柏木 厚典, 荒木 栄一, 他: 糖尿病 2012;55:485-504.
- 21) Pan S, Zhang H, Rush J, Eng J, Zhang N, Patterson D, Comb MJ, Aebersold R (2005) *Mol Cell Proteomics* 4:182-190
- 22) Bantscheff M1, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2007;389:1017-1031.
- 23) MacLean, B. et al. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2010;26: 966-968.
- 24) Chowdhury SK, Eshraghi J, Wolfe H, Forde D, Hlavac AG, Johnston D *Anal Chem. Mass spectrometric identification of amino acid transformations during oxidation of peptides and proteins: modifications of methionine and tyrosine. Anal Chem.* 1995; 67(2):390-8.
- 25) Guan Z, Yates NA, Bakhtiar R: Detection and characterization of methionine oxidation in peptides by collision-induced dissociation and electron capture dissociation. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2003 ; 14(6):605-13.
- 26) Brot N, Weissbach H : Biochemistry of methionine sulfoxide residues in proteins. *Biofactors.* 1991; 3(2):91-6.
- 27) Singh, P., Jain, A. & Kaur, G. Impact of hypoglycemia and diabetes on CNS: correlation of mitochondrial oxidative stress with DNA damage. *Molecular and cellular biochemistry* 2004;260:153-159.
- 28) Quagliaro, L. et al. Intermittent high glucose enhances apoptosis related to oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells: the role of protein kinase C and NAD(P)H-oxidase activation. *Diabetes* 2003;52:2795-2804.

## 9. 業績目録

### (I) 原 著

1. Momozono A, Kodera Y, Sasaki S, Nakagawa Y, Konno R, Shichiri M. Oxidised met147 of human serum albumin is a biomarker of oxidative stress, reflecting glycaemic fluctuations and hypoglycaemia in diabetes. *Scientific Reports*. 2020;in press
2. Momozono A, Kodera Y, Sasaki S, Nakagawa Y, Konno R, Shichiri M. Role of oxidized Met111 of human serum albumin for an oxidative stress biomarker in diabetes. *The Kitasato medical journal*. 2020;in press.
3. Suzuki S, Kodera Y, Saito T, Fujimoto K, Momozono A, Hayashi A, Kamata Y, Shichiri M : Methionine sulfoxides in serum proteins as potential clinical biomarkers of oxidative stress. *Sci Rep*2016; 6:38299. DOI: 10.1038/srep38299, 1-10.
4. Hoshiyama A, Fujimoto K, Konno R, Sasaki S, Momozono A, Kodera Y, Shichiri M: Identification of plasma binding proteins for glucosedependent insulinotropic polypeptide. *Endocrine journal* 2019;66:7:621-628.

### (II) 著 書

なし

### (III) 総説・講座

な し

### (IV) 症例・臨床治験・その他

1. 桃園明, 市川雷師, 河合沙友希, 星山綾子, 井上光子, 鈴木陽彦, 正木嗣人, 高井久仁庸, 山岸貴洋, 小川惇郎, 林哲範, 鎌田裕二, 高野幸路, 七里眞義 : 授乳による血糖低下を CGM で確認し得た CSII 使用中 1 型糖尿病の 2 症例. *糖尿病と妊娠* 2016;16:66-71.



## 10. 図表

表 1

	L-メチオニンあり メチオニン酸化レベル ( $\times 10^{-3}$ )	L-メチオニンなし メチオニン酸化レベル ( $\times 10^{-3}$ )	P値
直後	1.391 $\pm$ 0.321	1.354 $\pm$ 0.176	1.0000
1 週間後	2.216 $\pm$ 0.696	3.597 $\pm$ 1.634	<0.005
1 か月後	3.609 $\pm$ 0.970	10.48 $\pm$ 4.966	<0.005

表 2

	L-システインあり XIC 強度 ( $\times 10^9$ )	L-システインなし XIC 強度 ( $\times 10^9$ )	P値
カルバミドメチル化 (N 端) 非酸化型血清由来ペプチド	0.137 $\pm$ 0.052	9.641 $\pm$ 0.571	<0.005
カルバミドメチル化 (N 端) 非酸化型安定同位体標識ペプチド	1.017 $\pm$ 0.191	57.72 $\pm$ 2.932	<0.005

表 3 研究対象者の背景

	健常者	2 型糖尿病	P値
例数 (男性/女性)	34 (11/23)	40 (26/14)	
年齢 (歳)	55.0 $\pm$ 16.8	55.3 $\pm$ 13.1	0.7000
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	22.2 $\pm$ 2.9	28.9 $\pm$ 6.5	0.0004
<血液検査データ>			
HbA1c (%)	5.5 $\pm$ 0.4	8.9 $\pm$ 2.2	<0.0001
尿素窒素 (mg/dL)	13.9 $\pm$ 4.6	19.7 $\pm$ 18.0	0.2898
クレアチニン (mg/dL)	0.72 $\pm$ 0.13	1.53 $\pm$ 2.03	0.0044
eGFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	73.8 $\pm$ 13.7	64.7 $\pm$ 28.0	0.1674
総ビリルビン (mg/dL)	0.7 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.6	1.0000
中性脂肪 (mg/dL)	94.3 $\pm$ 49.1	185.0 $\pm$ 50.95	<0.0001
HDL コレステロール (mg/dL)	71.3 $\pm$ 17.4	47.2 $\pm$ 12.3	<0.0001
LDL コレステロール (mg/dL)	114.5 $\pm$ 21.5	107.1 $\pm$ 35.7	0.1365



図 1

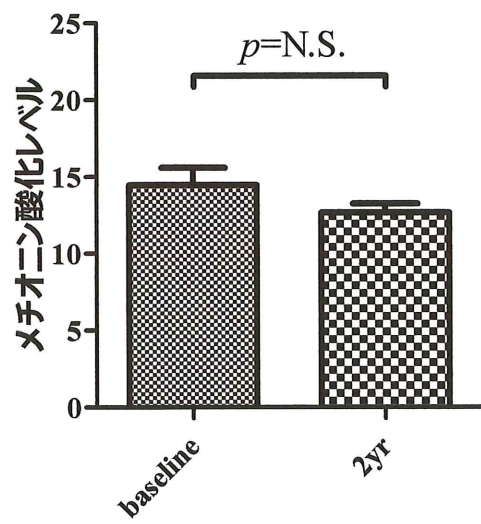


図 2

